AULAS PRÁTICAS NO MICROSCÓPIO ÓTICO

3
aula

META

Apresentar os procedimentos necessários para a focalização.
Realizar atividades experimentais.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
estar apto para manipular o microscópio durante a focagem do material.

PRÉ-REQUISITOS

O aluno deverá revisar os conteúdos referentes aos princípios básicos da microscopia ótica.

(Fonte: http://www.cienciaportugal.net).

Nesta aula, iremos manusear o microscópio pela primeira vez. Porém, antes de iniciarmos esta prática, é importante aprendermos alguns conceitos básicos sobre os tipos de cortes que facilitam a observação do material no microscópio.

INTRODUÇÃO

Apresentaremos a você a preparação do material a ser analisado e as etapas da confecção de preparação temporária e permanente. Além disto, você terá um passo-a-passo da etapa de focagem. Por último, apresentaremos cinco exemplos de experimentos com o microscópio. Será que deu para aguçar um pouquinho a sua curiosidade? Então, vamos em frente!

TIPOS DE CORTES

Os tipos de cortes utilizados em estudos anatômicos são os descritos a seguir.

Transversal - perpendicular ao maior eixo (Figura 1).

Figura 1 - Corte transversal. (Fonte: Azevedo, et al, 1993.)

Longitudinal - é feito paralelamente ao maior eixo (Figura2).

Figura 2 - Corte longitudinal. (Fonte: Azevedo, et al, 1993.)

Tangencial - quando o objeto de estudo é cilíndrico, o corte longitudinal pode ser tangencial, isto é, passa paralelamente em relação ao eixo sem passar por ele (Figura 3).

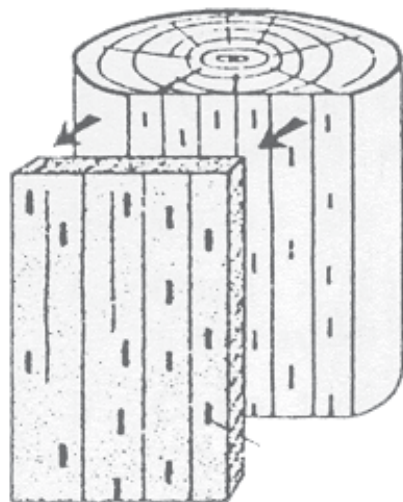



Figura 3 - Corte tangencial. (Fonte: Azevedo et al, 1993.)

Radial - quando o objeto de estudo é cilíndrico, o corte longitudinal pode ser feito passando pelo diâmetro (Figura 4).

Agora que explicamos os tipos de cortes que podem ser feitos, trataremos sobre os procedimentos corretos para preparação e manipulação do material no MO. Para isto, você deve seguir as etapas descritas a seguir.

PREPARAÇÃO DO MATERIAL

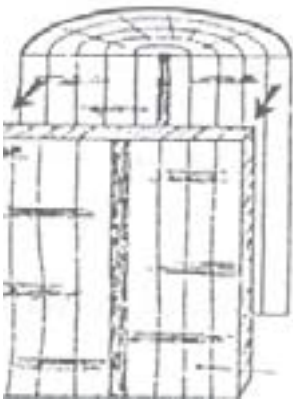



Figura 4 - Corte radial (Fonte: Azevedo et al, 1993).

Neste item serão abordadas as etapas básicas de montagem do material para análise no microscópio. É claro que, a depender do experimento, outras etapas podem ser acrescentadas.

O preparado pode ser temporário ou permanente. O primeiro é ideal para observações feitas antes de o material sofrer algum tipo de alteração, danificando suas estruturas. O último permite o uso prolongado, pois é feito para garantir a conservação do espécime.

CONFECÇÃO DE PREPARAÇÃO TEMPORÁRIA

- Transferir para a lâmina, com o auxílio de um estilete, o corte a ser examinado.
- Colocar, com um conta-gotas, água ou reagente sobre a lâmina de vidro.
- Cobrir com a lamínula: encoste um dos lados da lamínula na borda da gota do líquido utilizado e, então, abaixe-a lentamente para evitar a formação de bolhas.
- Restando algum excesso do líquido, retirar com papel filtro.

Para garantir uma boa observação, é necessário que sua preparação apresente as características descritas a seguir.

- Não deve haver bolhas de ar na lâmina, pois se apresentam escuras ao microscópio.
- O líquido deve estar bem distribuído.
- A lamínula deve estar bem acomodada sobre a lâmina, portanto, não pode estar flutuando.
- O excesso de líquido sobre a lâmina deve ser retirado para evitar que molhe a platina e dificulte a movimentação desta com o auxílio do Charriot.

CONFECÇÃO DE PREPARAÇÃO PERMANENTE

Fixação - É o processo pelo qual se obtém a preservação da morfologia e da composição química das células e dos tecidos o mais próximo do "in vivo". A escolha do fixador adequado depende da estrutura que se deseja observar. O formol, por exemplo, é comumente empregado para preservação de tecidos. Após a fixação, o material está muito mole para ser seccionado, apresentando pouca resistência mecânica. Assim, se tentássemos cortá-lo, poderíamos causar-lhe algum dano. Por isso, os próximos passos são importantes para conferirem rigidez à amostra, permitindo que seja cortada em pequenos pedaços.

Desidratação - Após a fixação, o material deve ter toda água completamente substituída por concentrações progressivamente crescentes de etanol, começando com 50 ou 70% e finalizando com etanol puro.

Infiltração com parafina - O agente colocado na etapa anterior será substituído por parafina para enrijecer o material, facilitando o corte em um aparelho adequado denominado **micrótomo** (Figura 5).

Micrótomo

Instrumento para cortar, nos tecidos animais ou vegetais, lâminas delgadas para exame ao microscópio.

Micrótomo mecânico Micrótomo elétrico

Figura 5. Imagens do micrótomo.

Corte - Fazer cortes finos no instrumento chamado micrótomo. O bloco de parafina, ao passar pela navalha do aparelho, é cortado em fatias cuja espessura foi predeterminada por um mecanismo de ajuste.

Com o material pronto para ser levado ao microscópio, deve-se, então, iniciar a etapa de focagem. Atente para as instruções que você deve seguir.

1. Com o microscópio ótico na bancada, confirme se a lente objetiva de menor aumento está encaixada e a lâmina foi abaixada. Lembre-se de que na bancada só deverá permanecer o material necessário para preparação da amostra.
2. Abra a presilha e coloque a preparação sobre a platina, segurando apenas nas bordas da lâmina para não manchá-la com sua digital.
3. Ligue a fonte de iluminação e regule a intensidade luminosa.
4. Observe se o diafragma está aberto, verificando se há passagem de luz através do orifício da platina. Caso não esteja aberto, faça a abertura do diafragma movimentando a alavanca correspondente.
5. Centralize a área a ser observada com auxílio do charriot.

6. Selecione a objetiva desejada girando o revólver para a posição correspondente. Verifique se a objetiva está encaixada através do ruído característico.
7. Olhando através da ocular e com a ajuda do parafuso macrométrico, aproxime a platina da objetiva até que consiga visualizar a preparação, tomando cuidado para não encostar demais a lâmina na objetiva e queimá-la. Em seguida, utilize-se do parafuso micrométrico para melhorar a focalização. Quando a observação for feita com a objetiva de imersão, deve ser colocada entre a preparação e a objetiva uma gota de óleo de imersão.
8. Explore o preparado movimentado o charriot.
9. Para evitar o aquecimento excessivo da lâmpada, ela deverá permanecer acesa exclusivamente durante o tempo da observação.
10. Após a observação do espécime, desligue a lâmpada. Em seguida, gire o revólver, encaixando a objetiva de menor ampliação; abaixe a platina, rodando o parafuso macrométrico, e retire a lâmina. Enrole o cabo elétrico na base do microscópio e coloque a capa sobre ele.
11. Ao final da aula, a bancada deverá estar limpa e, portanto, pronta para a próxima utilização.

Uma vez que você já leu atentamente as etapas do processo de focagem, vamos aos experimentos, pois é através deles que você, caro aluno, poderá colocar em prática toda a teoria que aprendeu até agora.
É bem provável que as dúvidas comecem a surgir nesta fase de aplicação dos conhecimentos. Mas lembre-se de que você tem a sua disposição um tutor para orientá-lo. Então aproveite esta oportunidade e procure discutir com ele tudo o que achar necessário.

EXPERIMENTOS

Para a realização das práticas, deverá haver os seguintes materiais:

- *lâmina:* é uma placa de vidro sobre a qual colocamos a amostra;
- *lamínula:* é uma lâmina diminuta e pouco espessa utilizada para cobrir a amostra que está sobre a lâmina;
- *placa de Petri:* recipiente de vidro ou plástico onde o material é depositado após ser seccionado (Figura 5(a));
- *gilete:* é utilizada para fazermos os cortes (Figura 5(b)).
- *seringa de insulina:* que chamaremos de estilete. É importante para auxiliá-lo no manuseio do material, pois facilita a sua transferência da placa de Petri para a lâmina (Figura 5 (c));

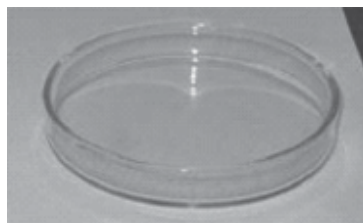



Figura 5 - Em destaque alguns materiais para as aulas práticas: (a) placa de petri, (b) gilete e (c) seringa de insulina.

Uma vez que você já conhece os materiais necessários para proceder à focagem, procure seguir as instruções corretamente.

Experimento 1 - Focalização

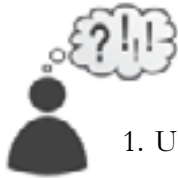
Tema: foco.

Objetivo: aprender a focar no microscópio óptico.

Material para observação: células da parede da cebola

Procedimento.

A primeira etapa deste procedimento consiste em fazer um corte fino de células da parede da cebola com o auxílio da gilete. Em seguida, você deve colocar os cortes na placa de Petri com água. Selecione os melhores cortes (os mais finos) para serem observados no microscópio. Com o auxílio do estilete, coloque vários cortes na lâmina. Adicione uma gota de água e cubra com a lamínula.

Depois de ter seguido todas as etapas do processo de focagem, desenhe o observado nas várias objetivas (no mínimo em duas). Anote ao lado de cada desenho o aumento da objetiva e a abertura numérica. E não se esqueça de responder à questão que apresentamos a seguir.

ATIVIDADES

1. Utilizando as diferentes objetivas, o que se pode dizer em relação ao tamanho da imagem e da área de observação?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Esta questão é importante para verificarmos como analisar o material. Uma objetiva de menor aumento permite-nos ter uma visão total da amostra, reconhecendo o que será visto como um todo. À medida que aumenta o tamanho da imagem, a observação deixa de ser geral para ser mais minuciosa.

Experimento 2 - Estômatos

Objetivo: observar os estômatos.

Material para observação – folha de *Rheo discolor*

Procedimento

Como você poderá verificar, este procedimento não é muito diferente do que fizemos na outra etapa. Então, preste atenção e siga os passos que lhe apresentaremos.

Faça um corte **paradérmico** na parte inferior da folha de *Rheo discolor* com o auxílio da gilete e deposite o material obtido na placa de Petri, que deverá conter água.

Esta espécie que pertence à família *Commelinaceae* é conhecida também como Tradescantia e tem as folhas largas, verdes na parte superior e arroxeadas na região inferior (Figura 6). Com o auxílio do estilete, transporte esse corte para a lâmina. Usando o conta-gotas, coloque uma gota d'água sobre o material, cubra-o com a lamínula e leve-o ao microscópio para observação.

Paradérmico

É um tipo de corte paralelo à superfície do órgão e superficial, sendo utilizado principalmente em estudo de folha.

Na ausência da *Rheo discolor*, podem ser utilizadas outras folhas para a realização deste experimento. Citamos esta apenas por garantir uma boa visualização dos estômatos. Na escolha de outras folhas, dê preferência às mais espessas, pois facilitará o corte.

Figura 6. (a) Planta da espécie Rheu discolor, (b) Destaque para a parte inferior da planta.

Assim como você procedeu no experimento anterior, desenhe o observado e identifique os constituintes do estômato. Neste experimento, também reservamos uma questão para você responder.

2. Determine a função de cada estrutura do estômato em observação.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Este tema lhe é familiar, pois já foi tratado, mesmo que superficialmente, no Ensino Médio. O estômato é uma estrutura que permite as trocas gasosas e de sais minerais através da folha. Para responder a esta questão, consulte algum livro de Biologia celular ou o seu livro de Biologia.

Experimento 3 - Observação de células da mucosa bucal humana.

Objetivo: observar a forma, o tamanho e o núcleo de uma célula animal.

Azul de metileno (AM)

É um corante catiônico solúvel em água ou em álcool, de fórmula molecular (C16H18ClN3S) e massa molar 319.8513 g/mol. O AM é usado como um corante bacteriológico e como indicador. Em sua forma oxidada é azul (MB+). Ele é facilmente reduzido à forma hidrogenada (azul de leucometileno, LB+), que é incolor.

http://pcserver.iqm.unicamp.br/~wloh/cursos/qf952/experimento1.html

Material para observação – células da mucosa bucal humana

Procedimento

Este terceiro procedimento é um pouco diferente dos outros dois já apresentados, pois você irá observar um material retirado do seu próprio corpo. Está preparado para começar esta prática? Então acompanhe os passos a seguir.

Raspe a bochecha com um palito de picolé e retire algumas células da mucosa bucal. Transfira o material do palito para a lâmina sem espalhá-lo. Com o auxílio do conta-gotas, pingue uma gotinha de **azul de metileno** e cubra o material com uma lamínula. Em seguida, leve-o ao microscópio para observação.

Neste procedimento, você também deverá desenhar o material observado e responder à questão que lhe preparamos.

3. Qual a posição que o núcleo ocupa dentro da célula?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

O núcleo é a região que ficou corada e tem um aspecto arredondado. O núcleo da célula vegetal e o da animal ocupam posições diferentes, pois o da vegetal fica numa posição mais periférica devido à existência de um vacúolo que ocupa a maior parte da célula. O vacúolo, exclusivo dos vegetais, corresponde a uma cavidade cheia de líquido. Em uma célula madura, chega a ocupar até 90% do volume celular, sendo o restante ocupado pelo citoplasma. Diferentes tipos de vacúolos com funções distintas podem ser encontrados em uma única célula vegetal.

Experimento 4 - Plastídeo

Objetivo: observar o amiloplasto.

Material para observação: fatia de batata

ENTENDENDO UM POUCO MAIS SOBRE OS PLASTÍDEOS

Antes de iniciarmos esta prática, é importante que tenhamos uma compreensão do material que será observado. As células vegetais têm três tipos de plastídeos: o cloroplasto está relacionado com a fotossíntese; o cromoplasto é responsável pela coloração amarela, alaranjada ou vermelha de muitas flores, folhas velhas, algumas frutas e raízes, como a cenoura; e o leocoplasto, que é um plastídeo de armazenamento, como no caso do amiloplasto que reserva amido.

Procedimento

Descascar um pedaço da batata. Em seguida, retirar com o auxílio da gilete uma fatia da batata e colocá-la sobre uma lâmina. Com o conta-gotas, adicionar uma gota do corante lugol sobre a amostra e, em seguida, cobrir com uma lamínula, levar ao microscópio e observar.

Desenhar o observado nomeando as partes.

4. Por que tivemos que usar corante nesta prática?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Para responder a esta questão, é necessário que você tenha entendido a função do corante para as observações no microscópio. Este assunto foi abordado na Aula 2.

Experimento 5: manipular a lupa.

Objetivo: observar o grão de pólen utilizando a lupa.

Material para observação: grãos de pólen

Procedimento

Recolher várias flores para retirar diferentes grãos de pólen. Com o auxílio de um pincel, remova-os ou, se preferir, retire somente as pétalas para facilitar a visualização. Coloque o pólen coletado em uma placa de Petri e observe-o na lupa.

Desenhar o observado.

5. Quais são as diferenças entre a focagem e a preparação de uma amostra para ser observada na lupa e no microscópio ótico comum utilizado para realizar os experimentos anteriores?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Como você fez todos os experimentos anteriores, fica bem fácil responder a este item, que é importante para saber se percebeu as diferenças no manuseio destes aparelhos e dos tipos de preparação que são adequados para cada um deles.

CONCLUSÃO

Manusear corretamente o microscópio é imprescindível para conseguir focar o espécime analisado e, conseqüentemente, obter uma melhor visualização. Alguns cuidados são importantes para garantirmos um tempo de funcionamento longo ao aparelho: (1) antes de ligarmos o MO, devemos conferir se a voltagem da tomada corresponde à do aparelho; (2) nunca arrastar o microscópio, quando for necessário retirá-lo do lugar, levante-o e, com bastante cuidado, deposite-o no local onde deverá permanecer; (3) utilize sempre o revólver na mudança de uma objetiva para outra, evitando, assim, que a lente se desencaixe e quebre; (4) limpe as lentes com um pano ou papel macio depois de usá-las. Utilize álcool, acetona ou xilol apenas quando for extremamente necessário, uma vez que o uso excessivo desses produtos pode desprender a lente da objetiva. Este aparelho é muito sensível e você deverá usá-lo com cuidado, pois será um instrumento muito útil durante todo o seu curso.

RESUMO

O procedimento correto para a focalização consiste em conferir se a lente objetiva de menor aumento está encaixada, depositar a amostra previamente montada entre a lâmina e a lamínula e colocá-la sobre a platina, segurando apenas nas bordas da lâmina para não manchá-la com a sua digital. Em seguida, ligue a fonte luminosa, centralize a região da lâmina que contém a amostra com auxílio do charriot, selecione a objetiva desejada, com ajuda dos parafusos macrométrico e micrométrico, e foque o material. Explore o preparado movimentando o charriot. Terminada a observação do espécime, desligue a lâmpada, encaixe a objetiva de menor aumento, abaixe a platina e retire a lâmina. Ao final da aula, a bancada deverá estar limpa.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, Aristéa Alves et al. **Anatomia das espermatófitas**: exercícios práticos. Viçosa (MG): Imprensa Universitária, 1993.

BENCHIMOL, Marlene et al. **Métodos de estudo de célula**. Editoração eletrônica. Fenorte/UENF. 1996.

COOPER, Geoffrey M. **A célula**: uma abordagem molecular. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005.

DE ROBERTIS, Eduardo; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GRIMSTONE, Albert Victor. **O microscópio eletrônico em biologia**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980.

JUNQUEIRA, Luiz Cunha Uchôa.; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

LEAL, Luiz Henrique Monteiro. **Fundamentos de microscopia**. Rio de Janeiro: UERJ, 2000.

VALLE, Francisco das Chagas. **Práticas de citologia e genética**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.